

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-342294

(43)Date of publication of application : 03.12.2003

(51)Int.Cl.

C07K 1/14

(21)Application number : 2002-147371 (71)Applicant : NIHON PHARMACEUTICAL CO
LTD

(22)Date of filing : 22.05.2002 (72)Inventor : HARA YUKIO
TANAKA HITOSHI

(54) METHOD FOR SUPPRESSING DEACTIVATION OF PROTEIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for stabilizing a protein which suppresses deactivation of the protein as much as possibly without suppressing deactivation of endotoxin in a surfactant treatment because, in some cases, the objective protein reduces its activity caused by degradation and denaturation when the protein containing the endotoxin is treated by the surfactant treatment to deactivate the endotoxin.

SOLUTION: This method solves the problems by adding an amino acid, sugars or a polyol as a stabilizer to a solution of the protein containing the endotoxin and then subjecting the protein to the surfactant treatment.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 07.04.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-342294

(P2003-342294A)

(43) 公開日 平成15年12月3日 (2003. 12. 3)

(51) Int.Cl.⁷

C 0 7 K 1/14

識別記号

F I

C 0 7 K 1/14

テームコード(参考)

4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願2002-147371(P2002-147371)

(22) 出願日

平成14年5月22日 (2002. 5. 22)

(71) 出願人 000231648

日本製薬株式会社

東京都千代田区東神田1丁目9番8号

(72) 発明者 原 幸生

千葉県成田市新泉3番地の1 日本製薬株式会社成田工場内

(72) 発明者 田中 仁

千葉県成田市新泉3番地の1 日本製薬株式会社成田工場内

(74) 代理人 100071973

弁理士 谷 良隆

Fターム(参考) 4H045 AA20 EA20 EA50 GA10 GA45

(54) 【発明の名称】 タンパク質の失活を抑制する方法

(57) 【要約】

【課題】エンドトキシン含有タンパク質を界面活性剤で処理してエンドトキシンを不活化する際、目的とするタンパク質が分解、変性して、その活性が低下する場合がある。そこで、界面活性剤処理において、エンドトキシンの不活化を抑制せず、タンパク質の失活を極力抑制するようなタンパク質の安定化方法を提供することにある。

【解決手段】エンドトキシン含有タンパク質溶液に、安定化剤としてアミノ酸、糖類またはポリオールを加え、界面活性剤処理することにより、前記課題を解決した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】エンドトキシンを含むタンパク質溶液をエンドトキシン活性の低減を目的として界面活性剤で処理する際、アミノ酸、糖類およびポリオールから選ばれた少なくとも一種を存在させることを特徴とするタンパク質の失活を抑制する方法。

【請求項2】界面活性剤が陰イオン界面活性剤、両性界面活性剤または非イオン界面活性剤である請求項1記載の方法。

【請求項3】界面活性剤がステロイド骨格を持つ化合物を主成分とする界面活性剤である請求項1記載の方法。

【請求項4】界面活性剤が、コール酸ナトリウム、3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸(CHAPS)またはポリオキシエチレンオクタフルフェニルエーテルである請求項1記載の方法。

【請求項5】界面活性剤の濃度が0.5~5w/v%である請求項1記載の方法。

【請求項6】アミノ酸の濃度が5~20w/v%である請求項1記載の方法。

【請求項7】アミノ酸がグルタミン酸、リジンまたはグリシンである請求項1または6記載の方法。

【請求項8】糖類の濃度が5~50w/v%である請求項1記載の方法。

【請求項9】糖類がショ糖またはマンニトールである請求項1または8記載の方法。

【請求項10】ポリオールの濃度が5~50w/v%である請求項1記載の方法。

【請求項11】ポリオールがエチレングリコール、ポリエチレングリコールまたはグリセロールである請求項1または10記載の方法。

【請求項12】請求項1記載の界面活性剤による処理の後に、タンパク質溶液を限外ろ過膜を用いて界面活性剤を除去することを特徴とするタンパク質含有水溶液の調製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エンドトキシンを含むタンパク質溶液をエンドトキシン活性の低減を目的として界面活性剤で処理する際、目的タンパク質の失活を抑制する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞膜構成成分であるリポ多糖とタンパク質の複合体であり、哺乳動物の体内に入ると動物を発熱させたり毒性を示す物質である。タンパク質を医薬品として用いる場合や、タンパク質を動物試験に用いる場合、使用に先立ちそのタンパク質溶液がエンドトキシンを含まないようにするか、または含まれているエンドトキシンを除去または不活化することが重要である。しかし、タンパク質溶液中

にエンドトキシンが含まれないようにするとか、含まれている場合にそれを除去または不活化することは容易なことではない。

【0003】従来エンドトキシンを除去する方法としては、分画法、陰イオン交換体などを用いたクロマトグラフィー法など、エンドトキシンと目的タンパク質にそれぞれ異なった挙動をとらせることによりエンドトキシンをタンパク質から分画する方法が知られている。また、エンドトキシンに特異的親和性を持つ、例えばポリミキシンBをリガンドとしたクロマトグラフィーを用いることも効果的である。しかしこれらの方法ではエンドトキシン画分と目的タンパク質画分を完全に分離することは難しい。一方、エンドトキシンを失活化する方法としては、タンパク質溶液を熱、酸、アルカリ、ある種の界面活性剤で処理する等の方法があげられる。しかし、これらの処理は多くの場合、目的とするタンパク質が致命的かつ不可逆的なダメージを受けてしまう。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、タンパク質溶液中に含まれるエンドトキシンの活性を界面活性剤を用いて低減する工程において、エンドトキシンの活性を減弱化し、目的とするタンパク質の活性をなるべく高く保持できる方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決するため、界面活性剤処理による目的タンパク質の変性を抑制する物質について種々研究を重ねた結果、処理時にアミノ酸、糖類またはポリオールを存在させることによってタンパク質が安定化させられることを知見し、さらに検討を重ねて本発明を完成した。

【0006】すなわち本発明は、(1)エンドトキシンを含むタンパク質溶液をエンドトキシン活性の低減を目的として界面活性剤で処理する際、アミノ酸、糖類およびポリオールから選ばれた少なくとも一種を存在させることを特徴とするタンパク質の失活を抑制する方法、

(2)界面活性剤が陰イオン界面活性剤、両性界面活性剤または非イオン界面活性剤である(1)記載の方法、

(3)界面活性剤がステロイド骨格を持つ化合物を主成分とする界面活性剤である(1)記載の方法、(4)界面活性剤が、コール酸ナトリウム、3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸(CHAPS)またはポリオキシエチレンオクタフルフェニルエーテルである(1)記載の方法、

(5)界面活性剤の濃度が0.5~5w/v%である

(1)記載の方法、(6)アミノ酸の濃度が5~20w/v%である(1)記載の方法、(7)アミノ酸がグルタミン酸、リジンまたはグリシンである(1)または

(6)記載の方法、(8)糖類の濃度が5~50w/v%である(1)記載の方法、(9)糖類がショ糖または

マンニトールである(1)または(8)記載の方法、

(10) ポリオールの濃度が5~50w/v%である
 (1) 記載の方法、(11) ポリオールがエチレングリコール、ポリエチレングリコールまたはグリセロールである(1)または(10)記載の方法、および(12)
 (1) 記載の界面活性剤による処理の後に、タンパク質溶液を限外ろ過膜を用いて界面活性剤を除去することを特徴とするタンパク質含有水溶液の調製方法、である。

【0007】

【発明の実施の形態】界面活性剤処理の対象となるエンドトキシン含有タンパク質としては、たとえば血漿タンパク質、遺伝子組換え生産タンパク質等があり、特に自体生理活性を有するタンパク質としては、たとえばトロンビン、アンチトロンビン、血液凝固第IX因子、プロテインC、プロテインSなど、原料またはいずれかの精製工程においてエンドトキシンが混入してくる可能性のあるタンパク質が挙げられる。安定化剤として使用するアミノ酸の種類は特に限定されないが、グルタミン酸、リジン、グリシン等が好ましい。その濃度は5~20w/v%が適当である。糖類としてはたとえば単糖、二糖、寡糖、糖アルコールなどが用いられ、その代表的な例として、たとえばショ糖、マンニトールなどが挙げられる。その濃度は5~50w/v%が適当である。

【0008】ポリオールとしてはたとえばエチレングリコール、分子量1,000~20,000のポリエチレングリコール、グリセロール等が例示され、それらの濃度は、5~50w/v%が適当である。界面活性剤の種類は特に限定されないが、陰イオン界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン界面活性剤が好ましく、特に好ましいものとしてコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸(CHAPS)などの分子中にステロイド骨格を持つ界面活性剤や、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルなどの非イオン界面活性剤などが挙げられる。タンパク質溶液中の界面活性剤の使用濃度は0.5~5w/v%程度が適当である。

【0009】界面活性剤によるエンドトキシンの失活化反応の反応温度、反応時間、pH等の条件は、目的とするタンパク質の安定性に従い決定すればよいが、通常反応温度は、4~25℃、反応時間は1分~24時間程度、pH範囲は5~9程度である。反応液は必要により攪拌することができる。添加した界面活性剤を除去する場合は、沈澱法、透析法、限外ろ過法等が好ましい。限外ろ過膜の分画分子量は、界面活性剤の大きさ、ミセルの状態、限界ミセル濃度、目的タンパク質の大きさなどの情報から総合的に判断すればよい。本発明は、タンパク質が高濃度の界面活性剤に曝露された場合のタンパク質の失活化を極力防ぐための方法を提供することにある。そのため、高濃度の界面活性剤にタンパク質が曝露される環境ならば、エンドトキシンの失活化を目的とす

ることに限らず使用することができる。その一例として、ウイルス不活化を目的とした溶媒・洗浄剤処理(S/D処理)が挙げられる。この場合は、タンパク質の失活化の程度とウイルス不活化の程度を総合的に評価し、条件を設定すればよい。

【0010】

【実施例】以下実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

実施例1

ヒト・アンチトロンビン-IIIの安定化剤の効果実験

(1) アンチトロンビン-IIIの調製

コーン低温エタノール分画の上清I約17.5リットルを400mLのDEAE陰イオン交換体により処理した後、未吸着画分をプールとして集めた。0.02Mのリン酸緩衝液(pH7.3)で前もって平衡化したヘパリン-セファロースゲル約370mLを充填したカラムに前述のプール画分を負荷した。引き続き、0.02Mのリン酸緩衝液、0.3M塩化ナトリウム溶液(pH7.3)3.0リットルで洗浄した後、0.02Mリン酸緩衝液、2.0M塩化ナトリウム溶液(pH7.3)3.0リットルでアンチトロンビン-IIIを溶出した。

【0011】ついで、ヘパリン-セファロースゲルから溶出したアンチトロンビン-III画分を限外ろ過装置(ボール社製 分画分子量10kDa)を用い、0.1M以下の塩濃度になるよう脱塩し、約200mLになるまで濃縮した。前記画分を0.01Mのリン酸緩衝液(pH7.0)で約1.0リットルに希釈した。前もって0.01Mのリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したQ-セファロースFFゲル(トリメチルアミノメチル/アガロース、アマシャムバイオサイエンス社製)約340mLに前述の希釈液を負荷した。次いで、0.01Mのリン酸緩衝液、0.12M塩化ナトリウム溶液(pH7.0)を6.0リットル送液して洗浄した後、0.01Mのリン酸緩衝液、0.17M塩化ナトリウム溶液(pH7.0)を3.0リットル送液しアンチトロンビン-IIIを溶出した。

【0012】この溶出画分をさらに精製するため、再度ヘパリン-セファロースゲル処理を行った。0.02Mのリン酸緩衝液(pH7.3)で前もって平衡化したヘパリン-セファロースゲル約370mLを充填したカラムに前述のQ-セファロースFFゲルの溶出液を負荷した。引き続き、0.02Mのリン酸緩衝液、0.3M塩化ナトリウム溶液(pH7.3)3.0リットルで洗浄した後、0.02Mのリン酸緩衝液、2.0M塩化ナトリウム溶液(pH7.3)3.0リットルでアンチトロンビン-IIIを溶出した。得られたアンチトロンビン-II溶液のうち300mLを限外ろ過膜(セントリプレッパ-10 ミリポ社製)を用いて、20mMクエン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム溶液(pH7.0)によりバッファーを交換した。得られた溶液中のア

ンチトロンビン-IIIの活性は120IU/mLであった。

【0013】(2) エンドトキシンを含むアンチトロンビン-III溶液の調製

得られたアンチトロンビン-III溶液1mLに、終濃度約100IU/mL程度となるよう、エンドトキシン溶液を添加した。さらに、アンチトロンビン活性が約5IU/mLとなるよう前記バッファーで希釈し、4℃に冷却した。一方、表1の終濃度となるよう、pH調整を行ったグルタミン酸ナトリウム、ショ糖、グリセロールの前述バッファー溶解液に、終濃度1w/v%となるよう5w/v%コール酸ナトリウム溶液を添加し、4℃に冷却した。これを界面活性剤を含む安定化剤溶液とした。次に、前述のエンドトキシン含有アンチトロンビン-III溶液0.1mLと、前述の界面活性剤含有安定化剤溶

液0.9mLを混合し、すばやく且つ十分に攪拌した。次に、4℃において2時間反応させ、エンドトキシンの失活化を行った。その後速やかに、アンチトロンビン活性(テストチームATIII・2キット第一化学薬品製)およびエンドトキシン活性(エンドスペシー 生化学工業社製)の測定を行った。被検溶液を、測定系への影響がないよう、それぞれの希釈緩衝液を用いて250または500倍に希釈し、各活性の測定を行った。この測定結果を表1に示した。界面活性剤によりエンドトキシンが全ての条件において十分に失活化していることが確認され、さらに安定化剤を含まないものに比べ、安定化剤を含有するものはアンチトロンビン活性が高率で保持され、安定化効果が奏されていることが確認された。

【0014】

【表1】

安定化剤	残存アンチトロンビンIII活性[%]	残存エンドトキシン活性[%]
未処理	100	100.0
安定化剤なし	29	0.6
10%グルタミン酸ナトリウム	62	0.3
20%ショ糖	97	0.7
20%グリセロール	93	1.0

【0015】実施例2

ヒト・プロテインSを用いた安定化剤の効果実験

(1) ヒト・プロテインS溶液の調製

ヒト血漿またはコーン分画で得たSI画分を、あらかじめ20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したDEAE-セファロースCL6Bに負荷した。試料を負荷した後、25mM塩化ナトリウムを含む平衡化緩衝液で洗浄し、ついで300mM塩化ナトリウムを含む平衡化緩衝液で溶出し、ヒト・プロテインSを含む画分を得た。

【0016】(2) 免疫吸着クロマトグラフィーによる精製

ヒト・プロテインSを含む画分に塩酸ベンズアミジンを終濃度が1~10mMとなるように加え、さらに塩化カルシウムを終濃度が2mMとなるように加えたのち、あらかじめ2mM塩化カルシウムおよび150mM塩化ナトリウムを含む平衡化緩衝液(pH7.4)で平衡化した。カルシウム存在下でのみヒト・プロテインSと結合する単クローン抗体を不溶化したカラムに負荷した。カラムを2mM塩化カルシウムおよび150mM塩化ナトリウムを含む平衡化緩衝液で洗浄したのち、5mMEDTA緩衝液(pH7.3)で溶出した。得られたヒト・プロテインS溶液30mLを限外ろ過膜(セントリプレッサー10:ミリボア社製)を用いて、20mMクエン酸ナトリウム150mM、塩化ナトリウム溶液(pH

7.0)にてバッファー交換した。このプロテインS溶液15mLに、終濃度80EU/mL程度となるよう、エンドトキシン溶液を添加した。さらに、前記バッファーで希釈し、4℃に冷却した。

【0017】一方、表2の終濃度となるようpH調整を行った各安定化剤の前述バッファー溶解液に、終濃度1w/v%となるよう5w/v%CHAPS溶液を添加し、4℃に冷却した。これを界面活性剤を含む安定化剤溶液とした。次に、前述のエンドトキシン含有プロテインS溶液1mLと、前述の界面活性剤含有安定化剤溶液1mLを混合し、素早く、且つ十分に攪拌した。4℃において17時間反応させ、エンドトキシンの失活化を行った。その後速やかに、プロテインS活性(スタクロット プロテインS: ロッシュ・ダイアグノスティックス社製)およびエンドトキシン活性(エンドスペシー; 生化学工業社製)の測定を行った。被検溶液は、測定系への影響が無いようそれぞれの希釈緩衝液で10倍以上希釈した。この測定結果を表2に示した。界面活性剤によりエンドトキシンが全ての条件において十分に失活化していることが確認され、さらに安定化剤を含まないものに比べ、安定化剤を有するものにはプロテインS活性が高率で保持され、安定化効果を示していることが確認された。

【0018】

【表2】

安定化剤	残存プロテインS活性(%)	残存エンドキシン活性(%)
未処理	100	100.0
安定化剤なし	89	0.3
5%グルタミン酸ナトリウム	97	0.4
5%グリシン	84	0.3
5%リジン塩酸塩	80	0.4
5%マンニトール	77	0.3
10%ショ糖	88	0.4
10%グリセロール	95	0.4
10%エチレングリコール	81	0.4
5%ポリエチレングリコール	84	1.1

【0019】実施例3

実施例1と同様にして、エンドトキシン含有アンチトロンビン-III溶液を調製した。次に安定化剤として最終濃度10w/v%のグリセロールを含み、さらに表3に示す界面活性剤を含むように調製し、これを界面活性剤含有安定化剤溶液とした。これらの液を10℃で保存した。次に前記エンドトキシン含有アンチトロンビン-II溶液1mLと界面活性剤含有安定化剤溶液1mLを混

合し、10℃、24時間反応させた後エンドトキシンの失活化を行った。その後速やかに、アンチトロンビン-III活性およびエンドトキシン活性の測定を行い、その結果を表3に示した。同じ界面活性剤を用いても、安定化剤の存否により残存アンチトロンビンIII活性に差のあることが確認された。

【0020】

【表3】

界面活性剤	安定化剤	残存アンチトロンビンIII活性(%)	残存エンドトキシン活性(%)
なし	-	100	100
5%トリトン X-100	-	66	6
5%トリトン X-100	+	83	2
3%CHAPS	-	78	2
3%CHAPS	+	84	2
0.5%コ-ル酸ナトリウム	-	56	14
0.5%コ-ル酸ナトリウム	+	88	14

+ : 安定剤添加

- : 安定剤無添加

【0021】実施例4

実施例1と同様の方法で、エンドトキシン含有アンチトロンビン-III溶液を調製した。また、安定化剤として最終濃度5、10または20w/v%のグルタミン酸ナトリウム、最終濃度5、20または50w/v%ショ糖、最終濃度5、20または50w/v%のグリセロールに界面活性剤として、最終濃度1w/v%コ-ル酸ナトリウムを加えたものを界面活性剤含有安定化剤溶液とした。これらの液を25℃で保存した。実施例1と同様

にして、前記エンドトキシン含有アンチトロンビン-II溶液0.1mLと界面活性剤含有安定化剤溶液0.9mLを混合し、エンドトキシンの失活化を行った。つづいてアンチトロンビン-IIIおよびエンドトキシン活性の測定を行い、その結果を表4に示した。この結果から、同じ安定化剤を用いても、アンチトロンビンIIIの安定効果は安定化剤の濃度に依存することが確認された。

【0022】

【表4】

安定化剤	残存アンチトロンビンIII活性(%)	残存エンドトキシン活性(%)
未処理	100	100
安定化剤なし	30	9
5%グルタミン酸ナトリウム	27	3
10%グルタミン酸ナトリウム	33	2
20%グルタミン酸ナトリウム	52	3
5%ショ糖	52	5
20%ショ糖	94	8
50%ショ糖	105	10
5%グリセロール	60	11
20%グリセロール	94	13
50%グリセロール	104	15

【0023】実施例5

実施例4と同様にしてエンドトキシン含有アンチトロンビン-III溶液を調製した。また、安定化剤として最終濃度20w/v%グリセロールを、界面活性剤として、最終濃度1w/v%コ-ル酸ナトリウムを含む界面活性剤含有安定化剤液を調製した。次いで、実施例1と同様にして、エンドトキシン含有アンチトロンビン-III溶液0.1mLと界面活性剤含有安定化剤溶液0.9mL

を混合し、エンドトキシンの失活化を行った。つづいて、緩衝液で40倍に希釈した後、分画分子量10kDaの限外ろ過膜を用いて緩衝液を交換し、界面活性剤を除去した。その後、エンドトキシンおよびアンチトロンビン-IIIの活性を測定し、表5に示す結果を得た。この結果から限外ろ過膜により界面活性剤が高度に除去され、且つ界面活性剤除去後も、低エンドトキシン活性を維持していることが確認された。

【0024】

【表5】

検体名	界面活性剤	安定化剤	残存アンチトロンビン活性[%]	残存エンドキシン活性[%]	ナール酸Na濃度[%]	タンパク質回収率[%]
UF処理前	—	—	100	100	1.0	100
安定化剤なし	+	—	26	3	<0.01	88
安定化剤あり	+	+	93	4	<0.01	88

【0025】

【発明の効果】本発明によれば、エンドトキシンを含有するタンパク質を、界面活性剤で処理してエンドトキシンを不活化または活性を低減するに際して、エンドトキ

シンの不活化、活性低下は抑制せず、タンパク質、特にアンチトロンビン-IIIなどのように自体生理活性を有するタンパク質の失活、活性低下を極力抑制し、タンパク質の収率を高いレベルに維持することができる。